

Zur Messung von
Uridindiphosphat-Galaktose
und
Uridindiphosphat-Glukose

Entwicklung zweier
radiometrischer Methoden
und Untersuchungen
bei Gesunden und
bei Patienten mit
Galaktosämie

Stefan Hoyer

1 9 8 8

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555407_0026

Aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med H.-B. Hadorn

Zur Messung von Uridindiphosphat-Galaktose
und Uridindiphosphat-Glukose

Entwicklung zweier radiometrischer Methoden
und Untersuchungen bei Gesunden und
bei Patienten mit Galaktosämie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefan Hoyer

aus Konstanz am Bodensee

im Jahr 1 9 8 8

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn
Prof. Dr. med. H. Mehnert

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. phil. Yoon Shin

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag des Rigorosums: 26. Mai 1988

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Wolf Endres

für seine Anregung zur Thematik
und seine fortwährend großzügige Unterstützung,

Frau Dr. phil. Yoon Shin,

deren Entwicklung einer praktischen Minisäule zur Ionenaustausch-
chromatographie (1) methodisches Fundament dieser und vieler
anderen Forschungsarbeiten und Erfolge war. Ihre ideenreiche,
konsequente Betreuung der Arbeit bleibt mir unvergeßlich,

Herrn Manfred Rieth,

der mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite stand.

Vitina Ferrera, Roland Emonts
und der Deutschen Hourdisfabrik GmbH.

Gewidmet meinen Eltern Alexander und Helga Hoyer
und meinen Freunden aus der Studienzeit

1.	Einleitung	1
1.1.	Galaktose	1
1.1.1.	Vorkommen	1
1.1.2.	Physiologischer Metabolismus	2
1.2.	Galaktosämie	3
1.2.1.	Mangel an Galaktokinase	3
1.2.2.	Mangel an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase	4
1.2.3.	Mangel an UDP-Galaktose-4-Epimerase	6
1.2.4.	Geschichte der Galaktosämieforschung	7
1.2.5.	Ausblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten	8

2.	Materialien	10
2.1.	Blutproben und Erythrozytenpräparation	10
2.2.	Chemikalien	10
3.	Methoden	11
3.1	Gemeinsame Messung von UDP-Galaktose und UDP-Glukose	11
3.1.1.	Prinzip	11
3.1.2.	Hämolysat, Hb-Messung	12
3.1.3.	Extraktpräparation	12
3.1.4.	Reaktionsgemisch	12
3.1.5.	Testansatz	13
3.1.6.	Standard	13
3.1.7.	Trennung von Substrat und Produkt	13
3.1.8.	Berechnung	14
3.2.	Korrektive Messung der UDP-Glukose	16
4.	Ergebnisse	18
4.1.	Absicherung der Methode der UDP-Galaktosemessung	18
4.1.1.	Recovery	18
4.1.2.	Beeinflussung durch EDTA	19
4.1.3.	Beeinflussung durch Auftauen	20
4.1.4.	Beeinflussung durch Galaktose-1-Phosphat	21
4.1.5.	Beeinflussung durch UDP-Glukose	22
4.1.5.1.	Bestimmung der Spezifität der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase	23

4.2.	Absicherung der Methode der Messung der UDP-Glukose	24
4.2.1.	Recovery der UDP-Glukose Messung	24
4.2.2.	Bestimmung der Spezifität der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase	24
4.3.	Untersuchungen in Erythrozyten-Proben	26
4.3.1.	Normwerte	26
4.3.2.	Patienten mit homozygotem Uridyltransferase-mangel	28
4.3.3.	Patienten mit homozygotem Epimerasemangel	29
4.3.4.	Patienten mit heterozygotem Uridylstransferase-mangel	29
4.3.5.	Patienten mit heterozygotem Epimerasemangel	30
5.	Diskussion	33
5.1.	Methode	33
5.2.	Ergebnisse	38
6.	Zusammenfassung	42
7.	Bibliographie	44
8.	Lebenslauf	51

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem physiologischen und pathologischen Stoffwechsel der Galaktose.

Es werden zwei neue radiometrische Methoden vorgestellt zur Bestimmung der Mengen an Uridindiphosphat-Galaktose und Uridindiphosphat-Glukose in Erythrozyten.

Weiterhin werden unter Anwendung der Methoden Normwerte für Stoffwechselgesunde erstellt und Untersuchungen an Patienten unternommen, die an angeborenen Störungen des Galaktosestoffwechsels leiden.

Schließlich wird geklärt, inwiefern die hier dargestellten Meßmethoden bei der Diagnosestellung und Therapieüberwachung der verschiedenen Formen der Galaktosämie verwandt werden können.

1.1 Galaktose

1.1.1 Vorkommen

Die Galaktose ist als Hexoaldose dem Traubenzucker sehr ähnlich. Sie unterscheidet sich von der Glukose nur durch die stereoisomere Anordnung der Hydroxylgruppe am vierten Kohlenstoffatom.

In der Natur kommt sie nur selten als Monosaccharid vor, um so häufiger jedoch als Disaccharid in β -glycosidischer Verbindung vereint mit der Glukose zur Laktose, dem Milchzucker (Galaktopyranosyl- β -(1-4)-Glucopyranose). Laktose ist das Hauptkohlenhydrat in Säugetiermilch und folglich in Kuhmilch und allen Milchprodukten reichlich zu finden. Ebenso in Muttermilch, wodurch sich ihre große Bedeutung für das Neugeborene erklärt. Galaktose findet sich aber auch reichlich in anderer Form gebunden, so in Cerebrosiden, Gangliosiden und Glycoproteinen. Galaktose ist in sehr vielfältiger Form in vielen Nahrungsmitteln enthalten (2), was im Zusammenhang mit angeborenen Stoffwechselstörungen von großer Wichtigkeit ist.

1.1.2. Physiologischer Metabolismus

Hier sei nur der Galaktosestoffwechsel erörtert, der seinen Ausgang von der Laktose nimmt, da er sicher der bedeutenste ist. Laktose wird nach oraler Aufnahme durch das Enzym Lactase hydrolysiert, welches in den Microvillae der Dünndarmzotten gebildet wird (2). Bei der Spaltung entstehen je ein Molekül Galaktose und Glukose.

Der Hauptstoffwechselweg der Galaktose besteht nun in ihrer Umwandlung zu Glukose durch eine Epimerisation der Hydroxylgruppe am vierten Kohlenstoffatom. Dazu benötigt der Organismus vier enzymatische Schritte, bei denen wiederum vier Zwischenprodukte entstehen nach folgendem Schema:

1. Gal. + ATP $\leftrightarrow$ Gal.-1-P. + ADP
2. Gal.-1-P. + UDP-Glu. $\leftrightarrow$ UDP-Gal. + Glu.-1-P.
3. UDP-Gal. $\leftrightarrow$ UDP-Glu.
4. UDP-Glu. + PP $\leftrightarrow$ Glu.-1-P. + UTP
- 4' UDP-Gal. + PP $\leftrightarrow$ Gal.-1-P. + UTP

Die Enzyme, die die 4 Reaktionen katalysieren, heißen in der selben Reihenfolge;

1. Galaktokinase
2. Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase
3. UDP-Galaktose-4-Epimerase
4. UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
- 4' UDP-Galaktose-Pyrophosphorylase
(ein Isoenzym der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase mit sehr geringer Aktivität)

Die Umwandlung von Galaktose in Glukose ist reversibel. Fast ausschließlicher Ort dieser Umwandlungen ist die Leber.

1.2. Galaktosämie

Galaktosämie ist ein zwar unpräziser, aber dennoch sehr geläufiger Begriff. Im engeren Sinne versteht man unter ihm das Krankheitsbild der angeborenen Stoffwechselstörung durch Fehlen der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase, die sogenannte "klassische" Galaktosämie. In Zuge neuerer Entdeckungen beinhaltet er auch Galaktosestoffwechselstörungen durch Galaktokinase- und Epimerasemangel.

1.2.1. Mangel an Galaktokinase

Das Fehlen von Galaktokinaseaktivität im Stoffwechsel verhindert die Phosphorylierung von Galaktose zu Galaktose-1-Phosphat und alle weiteren Schritte auf dem Weg zur Glukose. Das Leiden wird autosomal rezessiv vererbt mit einer Inzidenz von etwa 1:155000 (3).

Klinisch äußert sich der Enzymdefekt im Entstehen beidseitiger Katarakte. Diese bilden sich bei homozygot Erkrankten innerhalb des ersten Lebensjahres aus und führen unbehandelt zur Blindheit. Heterozygote erkranken später oder überhaupt nicht. 2% aller Katarakte im ersten Lebensjahr sind durch diesen Defekt bedingt (4). Weiter wurde gelegentlich das Syndrom des Pseudotumor cerebri beobachtet (5).

Pathophysiologisch erklärt sich die Entstehung der Linsentrübung durch einen alternativ beschrittenen Stoffwechselweg der Galaktose zu Galaktit, unter hauptsächlichlicher Vermittlung der Aldose-Reduktase (6). Galaktit wird massiv in der Linse gebildet (7) und diffundiert nur schwer wieder heraus. So stört es über eine Erhöhung der Osmolarität ihren Wasserhaushalt und viele weitere Stoffwechselprozesse. Das Syndrom des Pseudotumor cerebri ließe sich auch durch eine gleichartig hygroskopische Wirkung Galaktits im Gehirn erklären, wo es ebenfalls massiv gebildet wird.

Diagnostisch stößt man auf die seltene Krankheit durch eine Urinprobe. Da beim Galaktokinasemangel die Galaktose zum größten Teil unverändert über die Nieren ausgeschieden wird, findet man nach einer Milchmahlzeit eine reduzierende Substanz im Urin, die nicht mit Glukoseoxydase-Stäbchen reagiert. Diese läßt sich zwar über Dünnschichtchromatographie im Urin oder einen Guthrietest im Blut als Galaktose nachweisen, doch kommt es hier häufig zu falsch positiven wie auch falsch negativen Befunden bezüglich eines Enzymmangels. Bei Verdacht führt also nur der direkte Enzymassay auf Galaktokinase zur Diagnosestellung. Im Dr. von Haunerschen Kinderspital wurde hierzu ein gutes Testverfahren entwickelt (1).

Die Therapie besteht in einer lebenslangen galaktosefreien beziehungsweise galaktosearmen Ernährung, wobei hier aufgrund des relativ gutartigen Krankheitsbildes weniger rigoros verfahren werden muß als beim Uridyltransferasemangel.

Die Prognose ist unter dieser Behandlung sehr gut. Die Linsentrübungen bilden sich unter ihr bis auf unerhebliche Restläsionen zurück.

1.2.2. Mangel an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

Dieser ebenfalls autosomal rezessiv vererbbarer Enzymdefekt mit einer Inzidenz von etwa 1:40.000 (3) hindert den zweiten Umwandlungsschritt zur Glukose. Folglich staut sich im Stoffwechsel neben Galaktose, Galaktonat (beide harmlos) und Galaktit auch Galaktose-1-Phosphat an. Letzteres ist allem Anschein nach hochtoxisch und es entsteht das Krankheitsbild der klassischen Galaktosämie.

Klinisch (3) äußert sich dies in einer schweren Gedeihstörung des Neugeborenen. Einige Tage nach der ersten Milchfütterung reagiert es mit Erbrechen und Durchfall. Hinzutreten Ikterus, der durch eine schwere Hämolyse noch gesteigert sein kann, und eine Hepatomegalie. In schweren Fällen bildet sich ein Aszites und eine Laennecsche Zirrhose aus, die dann zum Tode führt.

Weitere klinische Frühsymptome sind rezidivierend hypoglykämische Anfälle und, wie beim Galaktokinase-mangel, beidseitige Linsentrübung und Pseudotumor cerebri.

Gefürchtetes Spätzeichen ist vor allem eine mäßige geistige Behinderung, bei Mädchen ein hypergonadotroper Hypogonadismus (8) und nach neueren Untersuchungen auch eine cerebelläre Ataxie (9, 10,) und eventuell eine Hypothyreose (11). Pathophysiologisch steht hier die Hypothese der Toxizität des Galaktose-1-Phosphats im Vordergrund aller Krankheitszeichen, die sich vom Bild des Galaktokinase-mangels unterscheiden. So werden die hypoglykämischen Anfälle durch eine Inhibition der Phosphoglucomutase der Leber erklärt (12), durch eine Störung der Freisetzung der Glukose aus Glykogen durch Galaktose-1-Phosphat.

Bei der Diagnosestellung behilflich ist der zusätzliche Befund einer Aminoazidurie und einer hyperchlorämischen Azidose als Zeichen einer tubulären Nierenschädigung, weiterhin der Nachweis reduzierender Substanzen im Urin und ihre Identifikation als Galaktose. Gesichert ist die Diagnose aber erst nach einem direkten Enzymassay der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase. Hier empfiehlt sich der sogenannte Beutlertest (13) auch zur Reihenuntersuchung. Im Dr. von Haunerschen Kinderspital ist hierzu auch ein eigenes sehr empfindliches Testverfahren im Gebrauch (14).

Die Therapie besteht in einer vollkommenen Galaktoseres-
trik-
tion. Sie sollte, wenn möglich, schon über die Mutter vorge-
nommen werden, denn vieles spricht für die Hauptverantwortlich-
keit der schon in utero gesetzten Schäden bei einem schlechten
Verlauf der geistigen Entwicklung (15). Sie sollte auch mög-
lichst lebenslang eingehalten werden, wenngleich das schwierig
ist, ist Galaktose doch in sehr vielen Lebensmitteln mehr oder
minder versteckt enthalten, so zum Beispiel in Konserven,
Erbsen, Weinbergsschnecken und Tabletten. Hierzu gibt es aber
sehr sorgfältig ausgearbeitete Richtlinien für jedes Alter
(2).

Je früher die Therapie einsetzt und je konsequenter sie eingehalten wird, desto eher ist die Prognose günstig zu stellen. Dennoch gibt es in neuerer Zeit Hinweise auf eine Selbstintoxikation der Patienten durch endogene Bildung von Galaktose-1-Phosphat über die Epimerase und UDP-Galaktose-Pyrophosphorylase und aus UDP-Glukose (3). Dies könnte erklären, warum die langfristige geistige Entwicklung mancher Patienten trotz strenger Behandlung beeinträchtigt war (16).

1.2.3. Mangel an UDP-Glukose-4-Epimerase

Dieser Enzymdefekt wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt. Er unterteilt sich in eine gutartige Form ohne klinische Symptomatik und eine schwere Form mit dem klinischen Vollbild der klassischen Galaktosämie. Bisher wurden von der gutartigen neun Fälle beschrieben (17,18), von der bösartigen Variante erst ein einziger (19).

Pathophysiologisch erklärt sich der Unterschied dadurch, daß die erste Form des Epimerasemangels nur auf die Blutzellen beschränkt bleibt, was keine Konsequenzen für den Gesamtstoffwechsel nach sich zieht. Dies trifft für den bisher einzigen schweren Fall nicht zu, da sich hier der Defekt in allen Zellen in gleicher Weise befindet.

In beiden Formen kann man eine Erhöhung des Galaktose-1-Phosphats in Erythrozyten feststellen. Die Diagnose wird durch eine Enzymassay mit der Methode nach Gitzelmann (20) oder einer neueren nach Shin et al. (21) gestellt.

Eine Therapie ist bei einer unauffälligen Variante nicht nötig. Beim generalisierten Epimerasemangel empfiehlt sich eine relative Galaktoserestriktion unter Kontrolle des Galaktose-1-Phosphats. Eine absolut galaktosefreie Ernährung ist hier zu vermeiden, da der Patient nicht auf endogenem Weg die Galaktose bilden kann, die er für den Aufbau von Zerebrosiden, Gangliosiden oder anderen wichtigen galaktosehaltigen Stoffwechselprodukten benötigt.

1.2.4. Geschichte der Galaktosämieforschung

Im Jahre 1908 beschrieb von Reuss in seinem Artikel über die "Zuckerausscheidung im Säuglingsalter" erstmals das Krankheitsbild und gab schon eine empirisch entwickelte Therapierichtlinie (22).

1933 konnte Fanconi bei einem 8-jährigen Jungen mit beidseitigen Katarakten Galaktose im Urin nachweisen und prägte den Ausdruck "Galaktosediabetes" (23).

Der Begriff "Galaktosämie" wurde 1935 von Mason und Turner eingeführt, die erstmals eine detaillierte klinische Schilderung und genaue Therapierichtlinien festlegten (24). Die Krankheitsursache blieb aber weiterhin ungeklärt.

Im Jahr 1938 entdeckte Kosterlitz in der Leber galaktosegefügter Kaninchen Galaktose-1-Phosphat (25) und postulierte 1943 die Existenz der Galaktokinase (26).

1949 gelang dann Caputto et al. der Nachweis der UDP-Glukose als entscheidendes Coenzym des Galaktosestoffwechsels (27). Einer ihrer Koautoren, Leloir, klärte dann im Jahr darauf durch die Entdeckung der UDP-Galaktose und ihrer Umwandlungsmöglichkeit zur UDP-Glukose mittels einer "Galaktose-Waldenase" endgültig den Stoffwechselweg der Galaktose zur Glukose (28). Die Beobachtung von Schwartz et al., daß bei Patienten mit Galaktosämie Galaktose-1-Phosphat erhöht ist, stellte 1956 den klinischen Zusammenhang zur biochemischen Grundlagenforschung her (29). So gelang es Kalckar et al. noch im selben Jahr, als Ursache der klassischen Galaktosämie den Mangel an Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase nachzuweisen (30). Die historische Tat seines engen Mitarbeiters Isselbacher liegt in der Entdeckung des zusätzlichen Stoffwechselwegs der Galaktose über die Pyrophosphorylase (31).

1965 entdeckte Gitzelmann den ersten Fall eines Galaktokinase-mangels, interessanterweise bei dem schon 1933 von Fanconi beschriebenen Fall mit Galaktosediabetes (32).

Es war wiederum Gitzelmann, der 1972 den ersten Fall des gutartigen Epimerasemangels beschrieb (33). 1980 wurde dann von Holton der erste und bis dato einzige Fall eines schweren generalisierten Epimerasemangel entdeckt (19).

1.2.5. Ausblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten

Die Ursache der Stoffwechselstörungen ätiologisch geklärt, verbleibt dennoch bis heute nur der symptomatische Behandlungsansatz der mühseligen Galaktoseres restriktion.

Dabei wurden schon einige Versuche unternommen, das Übel an der Wurzel zu packen, daß heißt, die UT-Aktivität zu erhöhen. Progesteron (34) und Menthol (35) erhöhten zwar den Anteil der zu Kohlendioxid abgebauten radioaktiv markierten Galaktose bei geringen Mengen, jedoch nicht bei größeren physiologischen Galaktosemengen (36). Corticosteroide zeigten keinen Effekt (36). Der Gabe von Orotsäure wurde zwar eine therapeutische Wirkung bei akutem Galaktosevergiftungssyndrom zugeschrieben, experimentell konnte ihr jedoch kein Einfluß auf den Galaktosestoffwechsel zugeschrieben werden (37).

So richtet sich die Hoffnung heute auf neue Gentechnologien und hier vor allem auf die sehr erfolgreichen Untersuchungen und Versuche mit dem Bakterium *E. coli*. In galaktosereichem Medium wird bei *E. coli*-Stämmen ein Galaktosemetabolismus induziert, der den gleichen Weg wie beim Menschen verfolgt (38-40). Mutanten wurden entdeckt, die unter jeweils einem oder mehreren Enzymmängeln leiden (41), sogar ein im Menschen noch unbekannter Pyrophosphorylasemangel wurde beschrieben (42, 43). Wie beim Menschen war ein UT-Mangel weitaus toxischer als ein Galaktokinase-mangel (44).

Eine Genkarte konnte auf dem *E. coli*-Chromosom aufgestellt werden. Es wurde ein Operon, bestehend aus den Genen Kinase-Transferase-Epimerase-Operator entdeckt, das Gen der Pyrophosphorylase konnte an einem anderen Ort nachgewiesen werden (45-47). Einige der störenden Mutationen lagen im Regulatorgen an anderem Ort, eine jedoch im Operator am Ende des Epimerasegens (48). Es gelang, ein normales Operon einer galaktoseoxidierenden Bakterie auf eine sogenannte Galaktosenegative mit defektem Operon zu übertragen und dort den Enzymdefekt zu korrigieren (49). Hierbei spielt ein lysogenes Virus "1 dg" die entscheidende Rolle.

Es ist als Bakteriophage in der Lage, einen Großteil der Galaktoseregion des Chromosoms im eigenen Genmaterial einzubauen (50) und dieses später auf dem Infektionswege auf einen galaktosenegativen Mutanten zu transduzieren (49).

Dieses Phänomen mag eines Tages in der menschlichen Gentechnologie Anwendung finden zur Korrektur angeborener Stoffwechselstörungen. Zumindest theoretisch scheint es möglich, ein nicht pathogenes Virus zu finden, das in gesunden menschlichen Fibroblastenkulturen in der Lage ist, spezielles genetisches Material zu inkorporieren und dann defekte Körperzellen mit Reparaturgenen zu infizieren. Es ist sogar schon gelungen, menschliche Fibroblasten mit UT Mangel auf diese Weise zu infizieren, und danach eine UT-Aktivität zu messen (51). Jedoch wurde bis heute noch kein Versuch unternommen, Menschen so zu therapieren.

2. Materialien

2.1. Blutproben und Erythrozytenpräparation

Die Blutproben stammen aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital. Für die Normwerte wurde Blut von Kindern verwendet, die nachweislich keine hereditäre Galaktoseverwertungsstörung hatten und bei denen auch keine andere Stoffwechselleiden bekannt waren, die die Messung hätten beeinträchtigen können. Desweiteren stellten sich das klinisch gesunde Personal des Stoffwechsellabors und Codoktoranden zur Verfügung. An dieser Stelle sei nochmals gedacht.

Die Blutproben der Galaktosämiepatienten und die ihrer Verwandtschaft stammten aus ganz Westdeutschland und zum Teil aus dem europäischen Ausland. All diese Patienten werden im Dr. von Haunerschen Kinderspital betreut beziehungsweise mitbetreut.

Intravenös entnommene Blutproben werden zentrifugiert und das Plasma vom Erythrozytensediment abpipettiert. Das so gewonnene Erythrozytenkonzentrat wird dreimal mit isotoner Kochsalzlösung versetzt, die nach jeweils sich anschließendem Zentrifugieren wieder abpipettiert wird (Waschung).

Die Erythrozytenkonzentrate werden in Eppendorfhütchen nach Markierung bei -20 Grad Celsius gelagert.

2.2. Chemikalien

Verwandt wurden:

C¹⁴-Glukose-1-Phosphat (NEN Products, Boston, USA)

C¹⁴-Galaktose-1-phosphat (Amersham Buchler, Braunschweig)

C¹⁴-UDP-Glukose (NEN Products, Boston, USA)

UDP-Galaktose (Sigma Chemie, München)

UDP-Glukose (Sigma Chemie, München)

Glukose-1-Phosphat (Boehringer, Mannheim)

Cysteinchlorid (Merck, Darmstadt)
Glycin-NaOH (Merck, Darmstadt)
Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt)
Trischlorid (Merck, Darmstadt)
Pyrophosphat (Sigma, München)
Uridintriphosphat (Sigma, München)
Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (Sigma Chemie, München)
UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (Boehringer, Mannheim)

3. Methoden

3.1. Die gemeinsame Messung von UDP-Galaktose und UDP-Glukose

3.1.1. Prinzip

Grundlage der Messung der UDP-Galaktose ist die Umkehrung der oben beschriebenen zweiten Reaktion der Umwandlung von Galaktose zu Glukose:



Verwendet wird das Enzym Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase und radioaktives Glukose-1-Phosphat. Durch Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Zellulose in der praktischen Minisäule nach Shin et al. (1) gelingt es exakt, im Reaktionsprodukt zwischen der Uridin-Diphosphat-Hexose und dem Monophosphatzucker zu trennen. Die so ermittelbare Menge radioaktiv markierter UDP-Glukose ist proportional zur ursprünglich eingesetzten an nicht markierter UDP-Galaktose. Verglichen werden nun präparierte Erythrozytenproben mit standardisierten Mengen an UDP-Galaktose.

Das verwandte Enzym ist jedoch nicht spezifisch für UDP-Galaktose, sondern setzt in genau der gleichen Weise UDP-Glukose um. Deshalb misst man in Erythrozyten UDP-Galaktose und UDP-Glukose gemeinsam. Eine Meßmethode zur korrektiven Bestimmung der UDP-Glukose wird später beschrieben.

3.1.2. Hämolsat, Hb-Messung

Das wiederaufgetaute Erythrozytenkonzentrat wird im Verhältnis 1:11 mit aqua bidestillata versetzt, und das Ganze mittels Rüttler gründlich gemischt.

10 μ l des so entstandenen Hämolsats werden mit 2.5 ml Transformationslösung vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur erschütterungsfrei stehengelassen. Anschließend wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

Extinkt. * Verdünn.-Quot. (1:11) * U.-faktor (36,8) = Hb in g/dl

3.1.3. Extraktpräparation

Das Hämolsat wird im Eppendorfhütchen für fünf Minuten bei 95 Grad Celsius erhitzt. Durch anschließendes Zentrifugieren setzt sich das ausgeflockte denaturierte Eiweiß und es bildet sich darüber die klare Flüssigkeit des sogenannten Überstandes.

3.1.4. Reaktionsgemisch

Das Reaktionsgemisch setzt sich aus vier gleich großen Teilen zusammen:

Ein Teil Glycin-NaOH, 0,6 mM, pH 8,2.

Ein Teil Cysteinchlorid, 0,2 M, pH 8,2.

(Das Cysteinchlorid muß jedesmal neu auf den pH von 8,2 titriert werden, da es sonst instabil ist).

Ein Teil Glukose-1-Phosphat, 0,6 mM

Ein Teil C¹⁴-Glukose-1-Phosphat (5 μ Ci/ml).

3.1.5. Testansatz

Der Überstand für die Reaktion wird vierfach weiter verdünnt auf den Faktor 1:44. 50 μ l dieses Überstandes werden mit 75 μ l Reaktionsgemisch und 4 μ l Uridyltransferaselösung (ca. 1/20 U pro Probe) für 60 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die Reaktion wird danach durch vierminütiges Erhitzen auf 95 Grad Celsius abgestoppt.

3.1.6. Standard

Mit 50 μ l aqua bidestillata (Nullwert) und 50 μ l der Standardlösungen von 2.5 beziehungsweise 5 μ M UDP-Galaktoselösung wird genau gleich verfahren.

Zur Qualitätskontrolle werden jeweils Triplets angefertigt.

3.1.7. Trennung von Substrat und Produkt

Hierbei wird die entstandene radioaktiv markierte UDP-Glukose vom eingesetzten, radioaktiv markierten Glukose-1-Phosphat durch Ionenaustauschchromatographie nach Shin et al.(1) getrennt.

Vorgehensweise: 2 ml Spritzen werden mit destilliertem Wasser mehrfach gespült und der Boden mit Glaswolle gestopft. Diese Spritzen werden nun in einem Plexiglasgestell aufgehängt und mit flüssiger DEAE-Zellulose (Chloridform) bis auf Höhe 1 cm gefüllt. Es entstehen die "Minisäulen".

2 ml Spülung mit 25 mM Salzsäure äquilibrieren sie.

Nun werden je 100 ml des Versuchsmediums auf jeweils eine Säule aufgetragen. Reste werden für den 100 % Aktivitätswert gesammelt.

Das C^{14} -Glukose-1-Phosphat wird mit 10 ml HCl 25 mM eluiert. Die zweifach negativ geladene UDP-Glukose ($2xPO_4^-$) bleibt in der Zellulose hängen, da sie bei diesem pH noch die negativen Chloridionen verdrängen kann. Eine Plastikwanne fängt die radioaktive monophosphathaltige Flüssigkeit auf, die dann ordnungsgemäß entsorgt werden muß. Jetzt wird die Wanne durch

Vials ersetzt. Diese fangen die radioaktiv markierte UDP-Glukose auf, die durch 3 ml HCl 150 mM eluiert wird. Das Eluat wird mit 20 ml Quickszint gemischt. Die Radioaktivität wird im Szintillationszähler gezählt.

3.1.8. Berechnung

Die Aktivitätswerte der Standardlösungen werden auf ein Koordinatennetz aufgetragen und liegen in diesem Bereich linear. Auf der durch sie gezogenen Geraden wird jede beliebige Aktivität abgelesen.

Auf den Wert $\mu\text{Mol/g Hb}$ kommt man durch dividieren des abgelesenen Werts durch den zuvorgemessenen Hämoglobingehalt der Probe. Da in " $\mu\text{Mol pro Liter}$ " gerechnet werden soll, das Hämoglobin aber in Gramm pro Deziliter angegeben wird, muß dieses Ergebnis durch den Faktor 10 geteilt werden.

Die Errechnung des Wertes in mg/dl erfolgt nach der Formel:

$$\text{mg/dl} = \frac{\text{cpm Probe} * 5 * 566,3 * 44}{\text{cpm Standard (5)} * 10000}$$

566.3 = Molgewicht UDP-Gal.

44 = Verdünnungskoeffizient

Anbei zwei Illustrationen zum Verhalten der UDP-Galaktosemessung im Bereich zwischen 0 und 100 μM UDP-Galaktoselösung.

Abbildung 1: Verhalten der UDP-Galaktosemessung im Bereich zwischen 0 und 100 μM UDP-Galaktoselösung

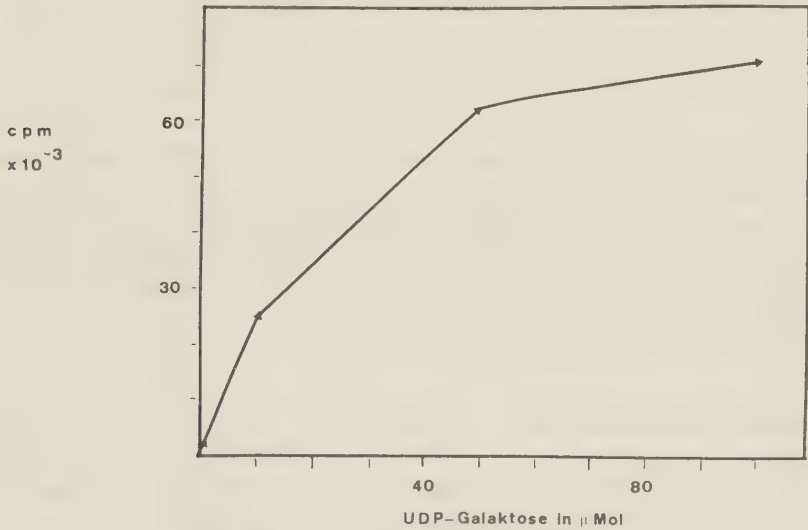
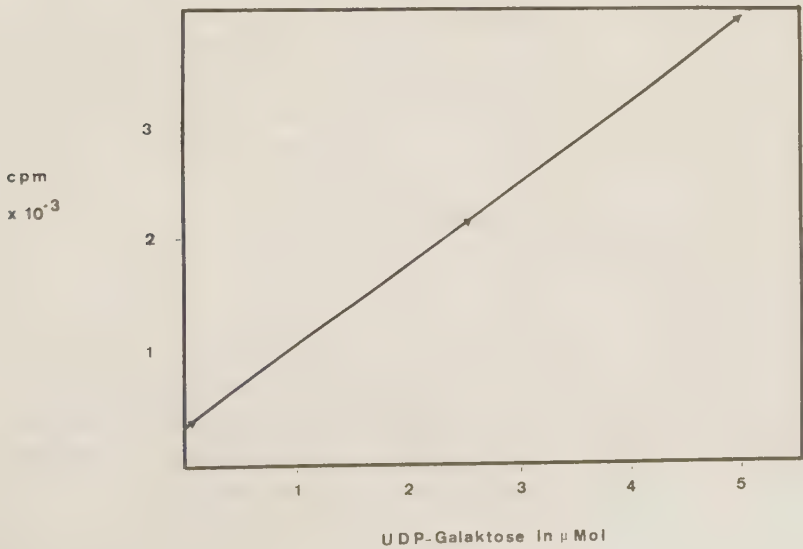


Abbildung 2: Verhalten der UDP-Galaktosemessung im Bereich zwischen 0 und 5 μM UDP-Galaktoselösung



3.2. Korrektive Messung der UDP-Glukose

Der Messung der UDP-Glukose liegt folgende Reaktion zugrunde:



Nach dem Prinzip der radioaktiven Verdünnungsmethode und unter Vermittlung der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase bleibt desto mehr radioaktiv markierte UDP-Glukose nach der Reaktion im Reaktionsgemisch je mehr nicht-markierte zu untersuchende UDP-Glukose eingesetzt wurde. Die Trennung zwischen Glukose-1-Phosphat und UDP-Glukose erfolgt wieder durch Ionenaustauschchromatographie in Shinscher Minisäule (1).

Vorgehensweise:

Erythrozytenpräparation, Hb-Messung und die Herstellung des Überstandes sind gleich der UDP-Galaktose Messung.

(2.3.1.-2.3.3.) Verwendet wird hier ein Hämolysat von 1:11.

Reaktionsgemisch: 2 Teile aqua bidestillata

2 Teile MgCl_2 100 mM (Merck, Darmstadt)

2 Teile Trischlorid 1 M pH 8.0 (Merck)

1 Teil Pyrophosphat 160 mM (Sigma, München)

1 Teil C^{14} -UDP-Glukose 5 $\mu\text{Ci/ml}$ (NEN, Boston)

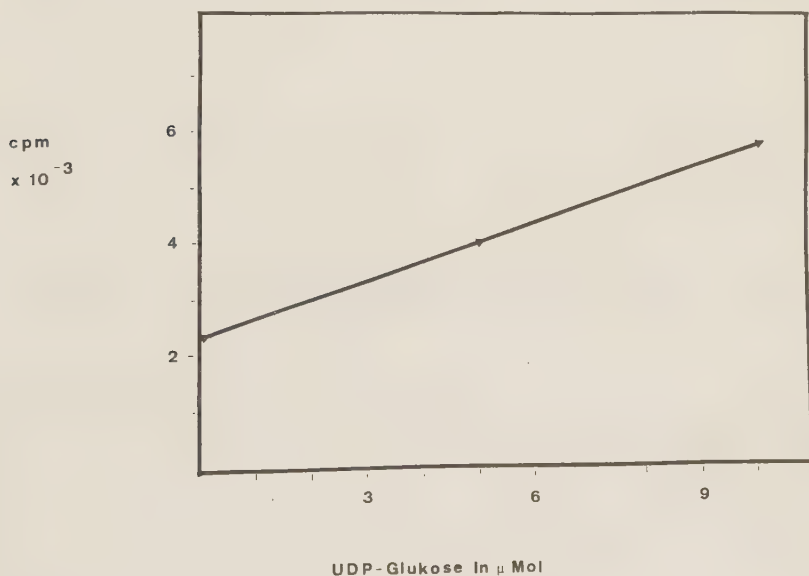
Standards: von 0.5 und 10 μMol UDP-Glukose.

Testansatz:

20 μl Standardlösung beziehungsweise Überstand (1:11) + 75 μl Reaktionsgemisch + 4 μl UDP-Glukose-PyrophosphorylaseLösung (20 U/ml) reagieren 15 Minuten bei 37 Grad Celsius. Abstoppen durch vierminütiges Erhitzen bei 95 Grad Celsius.

Auswertung: Zur Säulentrennung nach der gleichen Methode (1) wie bei der UDP-Galaktosemessung werden dem Reaktat jeweils 25 μ l Glukose-1-Phosphat 50 mM zugefügt. Das weitere Vorgehen und die Berechnung sind gleich der UDP-Galaktosemessung unter 2.3.6.

Abbildung 3: Verhalten der UDP-Glukosemessung zwischen 0 und 10 μ M Glukoselösung



4. Ergebnisse

4.1. Absicherung der Methode der UDP-Galaktosemessung

Um auszuschließen, daß bei der Messung der UDP-Galaktose methodische Fehler unterlaufen, wurden folgende Versuche unternommen.

In allen folgenden Messungen wird nur der mittlere Wert im Triplet verwendet. Nur zuverlässige Messungen werden berücksichtigt.

4.1.1. Recovery

Den Überständen wurden je 3.75 μMol UDP-Galaktose zugefügt bei ansonstem gleichem Vorgehen.

Tabelle 1: Recovery der UDP-Galaktosemessung

Probe/Pat.	c. p. m	Hb 1: 44	mMol UDP-Gal. / gHb	mg/dl
0 μMol UDP-Gal.	. 408			
5 μMol UDP-Gal.	3. 883			
10 μMol UDP-Gal.	7. 030			
St. 100 %	166. 246			
3740	1. 428	0. 750	1. 35 / 0. 180	3. 36
3740+				
3. 75 μMol UDP-Gal.	3. 303		3. 75	
3745	1. 025	0. 940	0. 8 / 0. 085	1. 99
3745+				
3. 75 μMol UDP-Gal.	3. 166		3. 65	
3746	2. 152	0. 700	2. 30 / 0. 328	5. 73
3746+				
3. 75 μMol UDP-Gal.	3. 994		5. 0	

Auswertung:

Der unter " uMol UDP-Gal." angegebene Wert ist der auf der Eichgeraden im Koordinatensystem abgelesene.

Aus ihm läßt sich errechnen: Recovery bei 3740 = 64 %
3745 = 77 %
3746 = 72 %

Der Versuch war zur Recovery war damit erfolgreich.

Anmerkung: Probe 3745 war zu stark verdünnt und daher falsch niedrig.

4.1.2 Beeinflussung durch EDTA

Die Messung der UDP-Galaktose wird durch Heparin nicht gestört. Ob dies auch für EDTA zutrifft soll hier geklärt werden. Zwei Blutproben wurden hier unmittelbar nacheinander einem klinisch gesunden Spender entnommen, das eine mal mit Heparin das andere mal mit EDTA versetzt.

Tabelle 2: Beeinflussung durch EDTA

<u>Probe Pat.</u>	<u>c. p. m.</u>
Heparin	2542
EDTA	2114

Die Messung der UDP-Galaktose wird durch EDTA nicht beeinflusst.

4.1.3. Beeinflussung durch Auftauen

Gemessen wurden die Standardlösungen von UDP-Glukose und UDP-Galaktose nach der Methode der Messung der UDP-Galaktose wie unter 2.3. beschrieben. Danach wurden sie dreimal eingefroren und wieder aufgetaut und ein zweites Mal gemessen.

Tabelle 3: Beeinflussung der UDP-Galaktosemessung und UDP-Glukosemessung durch Auftauen

Menge	UDP-Gal.		UDP-Glu.	
	c. p. m. frisch	c. p. m. alt	c. p. m. frisch	c. p. m. alt
0 μMol	.463	.463	.380	.380
2.5 μMol	5.756	4.820	5.288	3.375
5.0 μMol	10.050	7.120	9.665	6.600
10 μMol	18.326	12.020	16.721	12.217

UDP-Galaktose und UDP-Glukose sind auftaustabil.

4.1.4. Beeinflussung durch Galaktose-1-Phosphat

Die Blutprobe eines Patienten wurde wie oben beschrieben untersucht. Weiter wurden von derselben Blutprobe zwei weitere Messungen vorgenommen unter Hinzufügung von 5.5 mg/dl beziehungsweise 11 mg/dl Galaktose-1-Phosphats.

Tabelle 4: Beeinflussung durch Galaktose-1-Phosphat

<u>Probe Pat.</u>	<u>c. p. m.</u>
1	2.458
1+	
5.5 mg/dl	
Gal.-1-P.	2.450
1+	
11 mg/dl	
Gal.-1-P.	2.456

Die Messung der UDP-Galaktose wird nicht durch Galaktose-1-Phosphat beeinträchtigt.

4.1.5. Beeinflussung durch UDP-Glukose

3 Standards mit 0 μMol , 5 μMol und 10 μMol UDP-Galaktoselösung werden gemessen. Den gleichen Standards wurden dann 5 μMol , 10 μMol beziehungsweise 1mMol UDP-Glukose zugefügt.

Tabelle 5: Beeinflussung der UDP-Galaktosemessung durch UDP-Glukose

<u>Standard</u>	<u>c. p. m.</u>	<u>Standard</u>	<u>c. p. m.</u>
0 μMol UDP-Gal. +		0 μMol UDP-Gal. +	
0 μMol UDP-Glu.	. 408	5 μMol UDP-Glu.	3. 657
5 μMol UDP-Gal. +		5 μMol UDP-Gal. +	
0 μMol UDP-Glu.	3. 883	5 μMol UDP-Glu.	6. 775
10 μMol UDP-Gal. +		10 μMol UDP-Gal. +	
0 μMol UDP-Glu.	7. 030	5 μMol UDP-Glu.	9. 573
		0 μMol UDP-Gal. +	
		1 mMol UDP-Glu.	112. 547

Die Messung der UDP-Galaktose wird durch Vorhandensein von UDP-Glukose beeinträchtigt, und zwar in der Art, daß UDP-Glukose in gleicher Weise und Stärke reagiert.

4.1.5.1. Bestimmung der Spezifität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

Um die Ursache zu ergründen, weshalb die UDP-Glukose von der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase umgesetzt wird, wurde folgender Versuch unternommen:

Verschiedene Konzentrationen von UDP-Galaktose, UDP-Glukose und Gemische von beiden wurden nach dem Prinzip der Messung der UDP-Galaktose untersucht.

Tabelle 6: Bestimmung der Spezifität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase

Standard Menge	UDP-Gal. c. p. m.	UDP-Glu. c. p. m.	UDP-Gal. + UDP-Glu. c. p. m.
0 μMol	.380	.380	.380
2,5 μMol	5.152	3.375	
5 μMol	9.569	6.762	8.404
10 μMol	15.0709	12.791	14.785
20 μMol	26.879		25.644

Die Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase katalysiert auch die Reaktion:



und ist damit unspezifisch. UDP-Glukose wird dabei genauso stark umgesetzt wie UDP-Galaktose. Der Unterschied der Aktivitäten erklärte sich aus Schwierigkeiten, die beim Wiegen der UDP-Glukose aufgetreten waren.

Zur Messung der UDP-Galaktose war also eine Methode zu entwickeln, die unabhängig die Mengen an UDP-Glukose mißt und die dann von dem zuvor erzielten Wert abgezogen werden kann.

4.2. Absicherung der Methode der Messung der UDP-Glukose

4.2.1. Recovery der UDP-Glukose Messung

Zu 20 μ l Probe bzw. Standardlösung wurden jeweils 20 μ l H_2O hinzugefügt. Bei den Proben mit Recovery entsprechend jeweils 20 μ l UDP-Glukose 50 μ M bei ansonsten identischer Vorgehensweise.

Tabelle 7: Recovery der UDP-Glukose Messung

<u>Probe</u>	<u>c. p. m.</u>	<u>UDP-Glu.</u>
1	3.499	2
1 + 50 μ Mlsg	15.150	44,4

Auswertung: $(2+44,4):(2+50)=0,89$

Die Recovery lag bei 89% und war somit erfolgreich.

4.2.2. Zur Bestimmung der Spezifität der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase

Um sicher zu gehen, daß bei der Messung der UDP-Glukose nicht wiederum die UDP-Galaktose mitgemessen wird, wurde folgender Versuch unternommen. In Anlehnung an die Bestimmung der Aktivität der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (52) wurden zwei Reaktionsgemische angefertigt zur Umwandlung von Glukose-1-Phosphat beziehungsweise Galaktose-1-Phosphat, unter Verwendung der UDP-Glukose- Pyrophosphorylase.

Reaktionsgemisch 1

- 1 Teil C¹⁴ Glu.-1-P.
- 2 Teile Glu.-1-P. (7.5 mM)
- 3 Teile UTP
- 1 Teil DTT
- 1 Teil MgCl₂ (100 mM)
- 1 Teil Trischlorid pH 8.2
- 1 Teil aqua bidestilata

Reaktionsgemisch 2

- 1 Teil C¹⁴ Gal.-1-P.
- 2 Teile Gal.-1-P. (7.5 mM)
- 3 Teile UTP
- 1 Teil DTT
- 1 Teil MgCl₂ (100 mM)
- 1 Teil Trischlorid pH 8.2
- 1 Teil aqua bidestillata

Testansatz: 150 ul Rg. + 0,2 bzw. 2 U oder 20 U UDP-Glu-PPI
 Reaktionszeit: 30 Minuten bei 37 Grad Celsius
 Abstoppen und
 Leerwert: 5 Minuten bei 95 Grad Celsius
 Säulentrennung: In gleicher Weise wie bei der Messung der
 UDP-Galaktose.

Tabelle 8: Bestimmung der Spezifität der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase

Menge	Glu.-1-P. c. p. m.	Gal.-1-P. c. p. m.
Leerwert	1.130	.366
0,2 U	1.117	
2 U	10.486	.607
20 U	1.528	
Blut 1/500	2.038	
Blut 1/5		1.971
100%	92.790	163.802

Die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase ist bezüglich der UDP-Galak-tose nicht vollkommen spezifisch. Die Aktivität der UDP-Glu-PPI beträgt bezüglich Gal-1-P etwa 1/120 bis 1/200.

4.3. Untersuchungen in Erythrozyten

Die Methode der Messung der UDP-Galaktose war somit entwickelt und gegen Fehler abgesichert. Sie besteht aus der gemeinsamen Messung von UDP-Galaktose und UDP-Glukose, wie unter 3.1. beschrieben, und der sich anschließenden Messung der UDP-Glukose derselben Proben (s. 3.2.).

Die Bestimmung der Menge an UDP-Galaktose in Erythrozyten ergibt sich somit aus der einfachen Subtraktion der zweiten von der ersten Messung.

4.3.1. Normwerte

Es wurden die entsprechenden Konzentrationen in den Erythrozyten von weit über dreißig Personen gemessen. Die Kontrollpersonen litten unter keiner Stoffwechselstörung die die Messung der UDP-Galaktose hätten beeinträchtigen können. Die hier veröffentlichten Messungen bei 24 Personen wurden zum Teil mehrfach wiederholt und so zuverlässig ermittelt.

Tabelle 9: Normwerte

Kontr.	UDP-Gal. +UDP-Glu.		UDP-Glu.		UDP-Gal.	
	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl
1	0,334	4,87	0,007	0,113	0,372	4,76
2	0,345	5,11	0,062	0,962	0,274	4,15
3	0,395	5,44	0,062	0,849	0,333	4,59
4	0,391	5,78	0,039	0,566	0,290	5,21
5	0,487	7,36	0,036	0,560	0,451	0,68
6	0,262	2,83	0,000	0,000	0,262	2,83
7	0,344	3,74	0,000	0,000	0,344	3,74
8	0,417	6,68	0,092	1,472	0,325	5,21
9	0,407	5,78	0,016	0,249	0,391	5,53
10	0,467	4,64	0,019	0,311	0,448	4,33

Kontr.	UDP-Gal. +UDP-Glu.		UDP-Glu.		UDP-Gal.	
	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl
11	0,308	4,98	0,010	0,187	0,298	4,79
12	0,467	6,57	0,155	2,499	0,312	4,08
13	0,325	4,73	0,023	0,311	0,302	4,22
14	0,352	4,61	0,019	0,249	0,334	4,36
15	0,362	7,22	0,041	0,810	0,321	6,41
16	0,415	6,85	0,038	0,623	0,377	6,23
17	0,429	5,61	0,024	0,311	0,405	5,30
18	0,280	6,85	0,023	0,372	0,257	6,48
19	0,445	6,23	0,044	0,623	0,401	5,61
20	0,495	8,72	0,060	1,060	0,434	7,66
21	0,365	5,61	0,016	0,245	0,349	5,37
22	0,317	5,23	0,000	0,000	0,317	5,23
23	0,322	5,23	0,000	0,000	0,312	5,23
24	0,239	4,11	0,000	0,000	0,239	4,11

Spann-	0,262-	2,83-	0,000-	0,00-	0,262-	2,83-
weite	0,494	7,36	0,155	2,49	0,451	6,80
x	0,366	5,36	0,030	0,48	0,346	5,10
SD	0,069	1,65	0,035	0,57	0,061	1,06
x - SD	0,298	3,71	0,000	0,00	0,285	4,03
x + SD	0,435	7,00	0,065	1,04	0,407	6,15
x - 2 SD	0,229	2,07	0,000	0,00	0,225	2,97
x + 2 SD	0,503	8,65	0,100	1,61	0,468	7,22

4.3.2. Patienten mit homozygotem Uridyltransferasemangel

Bei den folgenden dreizehn Patienten wurde eine klassische Galaktosämie festgestellt. Sie werden im Dr. von Haunerschen Kinderspital betreut.

Tabelle 10: Patienten mit homozygotem Uridyltransferasemangel

Patient	UDP-Gal. +UDP-Glu.		UDP-Glu.		UDP-Gal.	
	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl
F. C.	0,228	2,95	0,084	1,06	0,144	1,89
G. R.	0,271	3,62	0,178	2,38	0,092	1,24
H. H-J.	0,174	2,38	0,031	0,43	0,143	1,96
G. B.	0,127	2,15	0,070	1,43	0,057	0,72
B. A.	0,171	1,74	0,007	0,13	0,167	1,26
B. H.	0,190	2,62	0,045	0,62	0,145	2,00
D. D.	0,176	3,11	0,049	0,87	0,127	2,24
W. G.	0,013	1,37	0,071	0,87	0,042	0,50
W. S.	0,172	2,24	0,100	1,31	0,072	0,93
G. S.	0,141	1,62	0,000	0,00	0,141	1,62
G. R. S.	0,096	1,50	0,024	0,37	0,072	1,13
B. T.	0,139	2,12	0,058	0,84	0,081	1,28
L. A.	0,240	3,86	0,056	0,87	0,184	2,99

Spann-	0,096-	1,30-	0,000-	0,00-	0,057-	0,72-
weite	0,271	3,81	0,178	2,38	0,184	2,99
x	0,173	2,44	0,057	0,83	0,116	1,61
SD	0,049	0,77	0,045	0,61	0,046	0,70
x - SD	0,124	1,67	0,012	0,21	0,071	0,91
x + SD	0,222	3,21	0,102	1,44	0,162	2,32
x - 2 SD	0,075	0,89	0,000	0,00	0,025	0,21
x + 2 SD	0,271	3,98	0,147	2,05	0,207	3,02

4.3.3. Patienten mit homozygotem Epimerasemangel

Die folgenden zwei Patienten werden ebenfalls im Dr. von Haunerschen Kinderspital betreut.

Tabelle 11: Patienten mit homozygotem Epimerasemangel

Patient	UDP-Gal. +UDP-Glu.		UDP-Glu.		UDP-Gal.	
	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl
Z. H.	0,408	4,77	0,000	0,00	0,408	4,77
B. H.	0,378	4,16	0,000	0,00	0,387	4,61

4.3.4. Patienten mit heterozygotem Uridyltransferasemangel

Die folgenden fünf Personen sind Verwandte von Patienten mit klassischer Galaktosämie.

Tabelle 12: Patienten mit heterozygotem Uridyltransferasemangel

Patient	UDP-Gal. +UDP-Glu.		UDP-Glu.		UDP-Gal.	
	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl
V. V.	0,377	5,78	0,018	0,28	0,359	5,50
V. E.	0,460	6,23	0,050	0,68	0,410	5,55
K. V.	0,527	7,72	0,059	0,87	0,468	6,85
K. S.	0,339	4,73	0,000	0,00	0,339	4,73
Y. G.	0,376	5,66	0,081	1,43	0,295	4,23

4.3.5. Patienten mit heterozygotem Epimerasemangel

Die den folgenden drei "Patienten" werden ebenfalls im Dr. von Haunerschen Kinderspital betreut.

Tabelle 13: Patienten mit heterozygotem Epimerasemangel

Patient	UDP-Gal. +UDP-Glu.		UDP-Glu.		UDP-Gal.	
	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl	$\mu\text{Mol/g Hb}$	mg/dl
K. V.	0,293	4,24	0,081	1,18	0,212	3,06
By. L.	0,348	3,99	0,033	0,37	0,315	3,62
By. A.	0,316	4,86	0,033	0,50	0,282	4,36

Korrektur

In den Überschriften zur Abbildung 4 und Abbildung 5 lies statt:
... Patienten mit Galaktokinase(mangel) (K), Transferase(mangel) (G),
Epimerase(mangel) (E) ...

richtig: ... gesunde Kontrollpersonen (K), und Patienten mit
Transferase(mangel) (G), Epimerase(mangel) (E) ...

Abbildung 4: UDP-Galaktosekonzentrationen in den Erythrozyten von Patienten mit Galaktokinasemangel (K), Transferasemangel (G), Epimerasemangel (E) und deren Heterozygote (hG, hE)

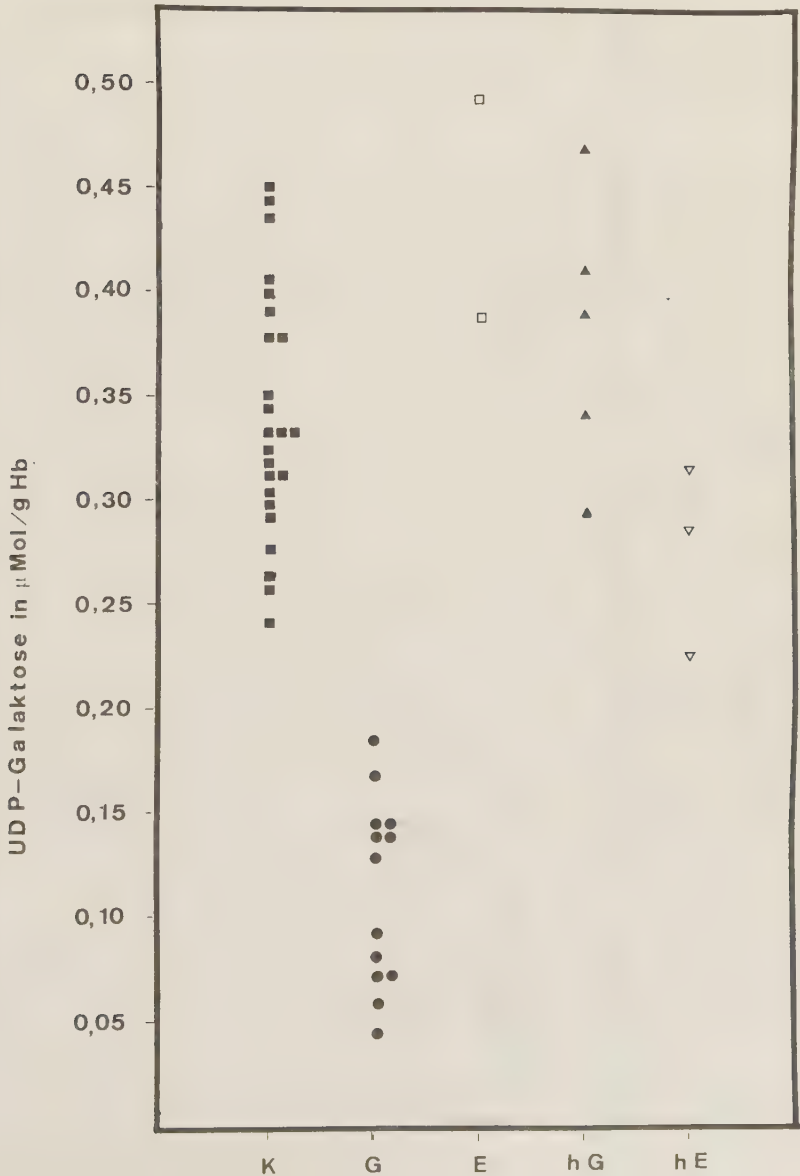
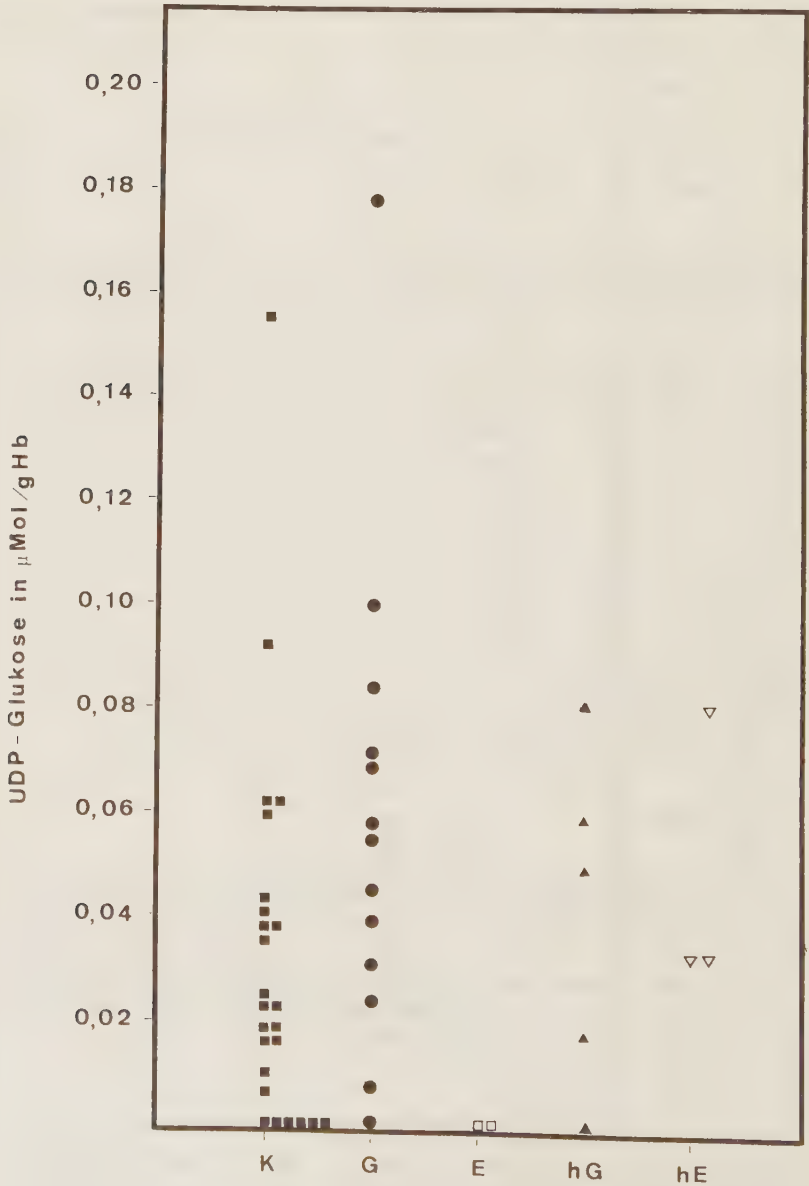


Abbildung 5: UDP-Glukosekonzentrationen in den Erythrozyten von Patienten mit Galaktokinasemangel (K), Transferasemangel (G), Epimerasemangel (E) und deren Heterozygote (hG, hE)



5. Diskussion

5.1. Methode

Seit der Entdeckung der Ursache der klassischen Galaktosämie konzentrierten sich viele Forschungen auf die Entwicklung von Methoden zur Messung der Aktivitäten der Enzyme des Galaktosestoffwechsels und der Menge der dabei entstehenden Metaboliten. Diese Vorhaben sind innerlich sehr eng verknüpft durch den Umstand, daß, um die Aktivität eines Enzyms zu bestimmen, mindestens zwei der Metabolite aktiv in der Methode verwandt werden beziehungsweise einer Messung zugeführt werden müssen. Gleichzeitig muß immer eine Einflußnahme der nicht direkt betroffenen Stoffwechselprodukte und Enzyme vermutet werden, und diese konnte auch oft genug nachgewiesen werden.

In diesem Sinne war bisher von der UDP-Galaktose hauptsächlich die Rede, wenn es um Entwicklungen von Methoden der Messung der UDP-Galaktose-4-Epimerase ging. Leloir entdeckte 1951 die Existenz von UDP-Galaktose und ihre Entstehungsmöglichkeit aus UDP-Glukose durch enzymatische Aktivität einer "Galaktose-Waldenase" (28). Im Zusammenhang mit der Entdeckung der UDP-Glukose durch Caputto et al. im Jahr zuvor (27) war damit der Stoffwechselweg der Galaktose zur Glukose aufgeklärt. Leloir konnte in *S. fragilis* ein Enzymgleichgewicht beim Verhältnis UDP-Galaktose zu UDP-Glukose von 1:3 feststellen. Er trennte beide Moleküle durch Säureäthanolchromatographie mit anschließender wässriger Lösung in Pyridinäthylazetat und absteigender Papierchromatographie (28).

Maxwell gelang es die Menge an UDP-Galaktose zu messen, die als Substrat zur Untersuchungen der Aktivität einer isolierten Epimerase verwandt wurde (53). Sie bestimmte die UDP-Galaktose nach Umwandlung in UDP-Glukose durch Hinzufügung von Epimerase. In einem zweiten Schritt wurde durch UDP-Glukose-Dehydrogenase die gebildete UDP-Glukose zu UDP-Glukoronat oxidiert. Das sich bei diesem Vorgang bildende NADH konnte spektrophotometrisch gemessen werden.

Gitzelmann entwickelte Jahre später eine Möglichkeit der Messung der Epimerase in Erythrozyten nach dem selben Prinzip (20) und einer Forschergruppe aus Japan gelang es, diese so zu vereinfachen, daß sie sich sogar zum Screening eignet (54).

Es lag daher auf der Hand, die Messung der UDP-Galaktose auf dieselbe Weise zu versuchen, unter Verwendung der UDP-Galaktose-4-Epimerase und anschließender spektrophotometrischer Bestimmung der gebildeten UDP-Glukose. Henderson hat dies versucht, konnte aber auch auf diese Weise keine UDP-Galaktose bei Kontrollpersonen finden, interessanterweise jedoch bei dem bisher einzigen Fall generalisierten Epimerasemangels (55). Dort stellte er die doppelte Menge an UDP-Galaktose gegenüber den hier gemessenen Normwerten fest.

Die Messmethode der UDP-Galaktose nach Henderson ist unserer Ansicht nach in mehrerer Weise zu kritisieren: Zum einen mißt sie zwangsläufig UDP-Galaktose und UDP-Glukose gemeinsam. Sie verwendet als Indikatorenzym UDP-Glukose-Dehydrogenase, welches mit der in Erythrozyten vorhandenen UDP-Glukose genauso reagiert wie mit der UDP-Glukose, die aus der erhofften Epimerisation aus UDP-Galaktose entstanden sein soll. Ob diese Epimerisation in Erythrozytenhämolysaten stattfindet, die eine gesunde eigene Epimeraseaktivität besitzen, ist zudem fraglich. Nach den von Leloir (28) gemachten Beobachtungen zum Epimerasegleichgewicht zwischen UDP-Galaktose und UDP-Glukose von 1:3 dürfte im gesunden Erythrozyten theoretisch dieses Gleichgewicht schon bestehen und sich nicht durch Hinzufügen von mehr Enzym ändern. Im pathologischen Erythrozyten mit defekter Epimeraseaktivität dürfte sich jedoch der Überschuß an UDP-Galaktose bis zur Wiedererlangung des Gleichgewichts in UDP-Glukose epimerisieren, was Hendersons Messung im Fall des von Holton et al. (19) beschriebenen Patienten erklären könnte. Da die Methode zwischen UDP-Galaktose und UDP-Glukose aber nicht zu unterscheiden vermag, ist sie auch hier als Methode zur Messung der UDP-Galaktose abzulehnen.

Zum Dritten bestehen auch prinzipielle Bedenken gegen die Verwendung des Enzyms Epimerase bei der Messung der UDP-Galaktose. Es benötigt NAD um aktiv zu werden (53) und wird durch NADH

gehemmt (56). Das Indikatorenzym UDP-Glukose-Dehydrogenase produziert NADH. Verwendet man beide Enzyme gemeinsam, hemmt die zweite die erste Reaktion. Hierbei ist es gleichgültig, ob man die Dehydrogenasereaktion vor der Epimerasereaktion verwendet oder umgekehrt, wie es Henderson versucht haben mag, um die UDP-Glukose von der UDP-Galaktose zu trennen. Verwendet man sie getrennt, wie in der Epimerasebestimmung nach Gitzelmann (20), ändert man nicht das eventuell schon vorhandene Gleichgewicht der ersten Reaktion.

Als letztes spricht die Abhängigkeit von der relativ ungenauen Spektrophotometrie gegen die Methode und dies alles erklärt vielleicht den Umstand, daß mit Hendersons Methode bei Normalpersonen keine UDP-Galaktose gemessen werden konnte.

Es empfiehlt sich zweierlei: Die Verwendung eines anderen Enzyms, der Uridyltransferase und die Hinwendung zu einer empfindlicheren chromatographischen Methode.

Ein sehr vielseitiges Instrument stellt die von Shin et al. entwickelte sehr kleine Säule zur DEAE-Säulenschichtchromatographie dar. Mit ihr gelang es, in den letzten zehn Jahren im Dr. von Haunerschen Kinderspital eine ganze Reihe von Methoden zu entwickeln, die auf exakte und vielfach erprobte Weise, praktisch jeden Aspekt des Galaktosestoffwechsels untersuchen können. So wurde eine Methode zur Messung der Aktivitäten der Galaktokinase (1), Uridyltransferase (15, 57), Epimerase (21), UDP-Glukose- bzw. UDP-Galaktose-Pyrophosphorylase (52) entwickelt, ebenso Methoden zur Messung des Metaboliten Galaktose-1-Phosphat (58) und so ist die hier vorgestellte Methode zur Messung der UDP-Galaktose die letzte Weiterentwicklung eines seit Jahren bewährten Prinzips. Daher kann die Verwendung dieses Verfahrens der DEAE-Säulenschichtchromatographie als methodisch hinreichend gesichert gelten, und es verbleibt noch eine genauere Untersuchung der Eignung der Galaktose-1-Phosphat Uridyltransferase:

Die Enzymaktivität wird nach Keppler et al. (59) durch die physiologische Substratmenge reguliert und weiter durch UDP-Glukose-Substratinhibition gebremst. Desweiteren hemmt Glukose-1-Phosphat (60) die Reaktion erheblich. Ebenso hemmend sollen sich auf kompetitive Weise UDP, UTP und andere Uridinnukleotide

auswirken (61). Da aber bei dem hier verwendeten Verfahren Glukose-1-Phosphat nicht als Produkt sondern als Substrat im Überschuß verwendet wird, läuft die Reaktion in die umgekehrte Richtung wobei Glukose-1-Phosphat keine Produkthemmung ausüben kann. Eine Produkthemmung durch UDP-Galaktose wurde von Bertoli und Segal verneint, ebenso irgend eine Hemmwirkung des Galaktose-1-Phosphats (60). Auch im eigenen Versuch konnte eine Hemmwirkung des Galaktose-1-Phosphats nicht festgestellt werden. Insofern ist das verwandte Enzym zur Messung der UDP-Galaktose geeignet. Eine Substratinhibition durch UDP-Glukose konnte bei den geringen Mengen an verwandter UDP-Galaktose nicht festgestellt werden. UDP-Glukose behindert jedoch die Messmethode aufgrund mangelnder Spezifität der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase. 1966 hatten schon Bertoli und Segal auf diesen Umstand hingewiesen. Auch in ihren Versuchen reagierten UDP-Glukose und UDP-Galaktose mit dem Enzym bei exakt gleichen Michaeliskonstanten und V_{max} . Beim Versuchsaufbau mit markiertem Galaktose-1-Phosphat und Messung des markierten Produkts UDP-Galaktose vermuteten sie daher eine Fehlermöglichkeit durch Reaktion des markierten Galaktose-1-Phosphats mit dem schon markierten Produkt und daher eine insgesamt abnehmende Bildung von markierter UDP-Galaktose (60). Prinzipiell ist der gleiche Fehler bei der hier verwandten Rückreaktion zu vermuten. Er ist aber unerheblich, da er beim Standard und in den Erythrozytenproben in gleicher Weise auftritt.

Hingegen unterscheiden sich Standard und Erythrozytenproben dadurch, daß im Erythrozyten sich noch zusätzlich UDP-Glukose befindet, die aufgrund der besagten mangelnden Spezifität des Enzyms in gleicher Weise mitgemessen wird. Dieser Fehler wurde jedoch erkannt, im eigenen Versuch begründet, und durch Entwicklung eines Meßverfahrens zur Messung der UDP-Glukose korrigiert. Es besteht in der Dephosphorylierung der UDP-Glukose durch das Enzym UDP-Glukose-Pyrophosphorylase nach Hinzufügung einer fixen Menge markierter UDP-Glukose. Je mehr der zu messenden UDP-Glukose eingesetzt wurde, desto mehr der markierten UDP-Glukose bleibt von der Dephosphorylierung verschont. Die sich anschließende Säulentrennung zwischen UDP-Glukose und Glukose-1-Phosphat erfolgt nach bewährter Methode. So verbleibt

wiederum die Frage nach der Eignung des Enzyms Pyrophosphorylase bei der Kritik der Methode der korrektiven UDP-Glukosemessung. Das kristalline Menschenleberenzym reagiert auch mit UDP-Galaktose (62), was eine mögliche Fehlerquelle darstellt. Jedoch konnte im eigenen Versuch zur Spezifität nur eine Aktivität bezüglich der UDP-Galaktose von etwa 1:100 bis 1:200 festgestellt werden, die unerheblich ist. Weiter soll das Enzym durch Galaktose-1-Phosphat gehemmt werden (63). Dies würde aber bedeuten, daß die Patientengruppe mit klassischer Galaktosämie prinzipiell eher niedrige Werte bei der UDP-Glukosemessung aufweisen müßten als die der Normalpersonen. Das traf aber nicht zu - im Gegenteil waren die gemessenen Werte bei Patienten etwas höher und dies spricht gegen eine störende Hemmung der Methode durch Galaktose-1-Phosphat. Deshalb darf das Enzym Pyrophosphorylase zur Messung der UDP-Glukose grundsätzlich auch als geeignet angesehen werden.

Die hier beschriebene Methode zur Messung der UDP-Galaktose stellt demnach eine unkomplizierte, exakte Möglichkeit dar, die Menge des Metaboliten UDP-Galaktose in Erythrozyten zu bestimmen.

Sie besteht in der gleichzeitigen Messung der UDP-Galaktose und der UDP-Glukose unter Verwendung des Enzyms Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase (3.1.) und in der darauffolgenden Messung der UDP-Glukose mit Hilfe der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (3.2.). Die Menge der UDP-Galaktose ergibt sich aus der Subtraktion der gemessenen Menge UDP-Glukose von der Gesamtmenge.

Die Methode zur korrektiven Messung der UDP-Glukose ist etwas weniger empfindlich, jedoch waren auch hier die Ergebnisse reproduzierbar. Ein Versuch zur Recovery der UDP-Glukosemessung verlief ebenfalls erfolgreich.

Es hat sich sogar gezeigt, daß in der Praxis auf die ganze zweite Messung der UDP-Glukose verzichtet werden könnte, da die Menge der gemessenen UDP-Glukose grundsätzlich viel geringer ist und sich im mehr oder minder konstantem Verhältnis zur UDP-Galaktose verhält (siehe Diskussion Ergebnisse). So könnte man sich einfach mit einem Ergebnis zufrieden geben, daß circa 10%-20% unter dem Wert der ersten Messung liegt, und sich so den zweiten Arbeitsgang sparen, ohne sehr ungenau zu sein.

Die gemeinsame Messung von UDP-Galaktose und UDP-Glukose in der ersten Messung wurde auf weitere Fehlerquellen untersucht. Ein Versuch zu ihrer Recovery verlief erfolgreich (2.4.2.). Weder Heparin noch EDTA waren hinderlich (2.4.1.), und ein möglicher Fehler durch wiederholtes Auftauen (2.4.5.) konnte auch ausgeschlossen werden.

5.2. Ergebnisse

Es wurden insgesamt über 100 Personen untersucht. Empirisch stellte sich dabei heraus, daß der immer wieder verwendete Standard an UDP-Galaktose auf die Dauer durch wiederholtes Auftauen (mehr als fünfmaliges) degenerierte und somit alle Werte, sowohl die der Kontrollpersonen wie auch der Patienten sich mehr und mehr nach oben hin verschoben. Dabei blieb der relative Unterschied zwischen den beiden Gruppen aber immer gleich. Dennoch ist die Auftauempfindlichkeit nicht so erheblich, als daß dies bei der Behandlung der Erythrozytenkonzentrate zu Konsequenzen bezüglich des normalerweise 1-2 maligen Auftauens führen müßte. Alle hier veröffentlichten Messungen können aber durch zum Teil mehrfache Wiederholung bei frischem Standard als gesichert gelten. Es wurden weiterhin nur Werte veröffentlicht, bei denen beide Messungen erfolgreich durchgeführt wurden.

Der Durchschnitt der 25 Kontrollpersonen bezüglich der "reinen" UDP-Galaktose lag bei $0,346 \mu\text{Mol/g Hb}$ bzw. $5,1 \text{ mg/dl}$. Will man den Normbereich als den innerhalb einer Standardabweichung definieren, kommt man auf den Bereich von $0,285 - 0,407 \mu\text{Mol/g Hb}$ bzw. zwischen $4,03 - 6,15 \text{ mg/dl}$ UDP-Galaktose. Will man auch eventuelle Ausreißer berücksichtigen, so finden sich alle Normwerte im Bereich zweier Standardabweichungen zwischen $0,255$ und $0,468 \mu\text{Mol}$ bzw. $2,97 - 7,22 \text{ mg/dl}$ UDP-Galaktose.

Auf gleiche Weise läßt sich der Normbereich der UDP-Glukose definieren als durchschnittlich um $0,03 \mu\text{Mol/g Hb}$ bzw. um $0,48 \text{ mg/dl}$ gelegen, bei Bereichen zwischen $0,0 - 0,065 \mu\text{Mol/g Hb}$ bzw. zwischen $0 - 1,04 \text{ mg/dl}$ bei erster Standardabweichung

und zwischen 0 - 0,100 $\mu\text{Mol/g}$ Hb bzw. 0 - 1,61 mg/dl bei der zweiten.

Die relativ geringe Menge an UDP-Glukose im Vergleich zur UDP-Galaktose hat überrascht, insofern als die UDP-Glukose eine weitaus größere Rolle im Stoffwechsel der Erythrozyten spielen sollte als die UDP-Galaktose vor allem bei Erwachsenen. In den hier angestellten Untersuchungen schwankte sie aber meistens um den Wert von 10%-20% der UDP-Galaktosemessung. Dies widerspricht ebenfalls Leloirs Behauptung, das Reaktionsgleichgewicht der UDP-Galaktose-4-Epimerase sei beim Verhältnis von UDP-Galaktose zu UDP-Glukose von 1:3 erreicht (28), wobei hier fast das umgekehrte Verhältnis vermutet werden könnte. Unter Umständen entstand die Hauptmenge an UDP-Galaktose aus den Zellmembranen in denen sie vermehrt enthalten ist.

Interessant wäre eine eventuelle Überprüfung durch Entwicklung einer spektrophotometrischen Meßmethode der UDP-Glukose in Erythrozyten mittels UDP-Glukose-Dehydrogenase.

Als wohl am sichersten darf hingegen die Erkenntnis gelten, daß bezüglich der mit dieser Methode gemessenen Mengen an UDP-Galaktose ein klarer Unterschied besteht zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den Patienten mit klassischer Galaktosämie.

Bei letzteren wird ein durchschnittlicher Wert ermittelt, der mit 0,116 $\mu\text{Mol/g}$ Hb bzw. 1,61 mg/dl nur etwa ein Drittel der Kontrollpersonen erreicht. Selbst wenn man den Bereich zwischen zwei Standarddifferenzen von 0,025 - 0,207 $\mu\text{Mol/g}$ Hb bzw. 0,21 - 3,02 mg/dl sehr weit steckt, gibt es doch zwischen der Gruppe der Gesunden und der der Kranken keinen Berührungspunkt, was auch gut in der graphischen Übersicht erkennbar ist. Somit eignet sich die Messung der UDP-Galaktose als weiteres Kriterium zur Unterscheidung zwischen UT-Galaktosämiepatienten und Gesunden, wenngleich sich die Methode nicht zur sicheren Diagnosestellung eignet.

Bezüglich der in dieser Gruppe gemessenen Mengen an UDP-Glukose bleibt zu sagen, daß sie hier mit durchschnittlich 0,057 $\mu\text{Mol/g}$ Hb fast doppelt so groß war, wie bei der Kontrollgruppe. Bei der gleichzeitig um zwei Drittel verringerten Menge an UDP-Galaktose bedeutet das bei Galaktosämiepatienten ein

Verhältnis UDP-Galaktose zu UDP-Glukose von 2:1. So trägt die Messung der UDP-Glukose noch zur stärkeren Trennung der beiden Gruppen bei.

Wollte man aus Gründen der Arbeitersparnis auf die Messung der UDP-Glukose verzichten, ist dies bei beiden Gruppen möglich. Bei der Kontrollgruppe müßten durchschnittlich 15% des Ausgangswertes abgezogen werden, bei Patienten mit Uridyltransferasemangel durchschnittlich jedoch 35%.

Das Ergebnis an sich - die signifikante Erniedrigung der UDP-Galaktose bei Galaktosämiepatienten - ließe sich durch die Krankheitsursache, den UT-Mangel selbst leicht erklären. Da der Enzymdefekt unmittelbar vor dem Schritt zur Bildung der UDP-Galaktose liegt, und das toxische Galaktose-1-Phosphat dadurch bis zu elffach erhöht gemessen werden kann, war anzunehmen, daß die Menge des folgenden Stoffwechselprodukts erniedrigt sein müßte. Daß die Menge der UDP-Galaktose nicht gleich null ist, erklärt sich hier aus der intakten Aktivität der UDP-Galaktose-4-Epimerase.

Es wurden zwei Patienten mit homozygotem, auf Erythrozyten beschränktem Epimerasemangel untersucht. Die Ergebnisse könnten den Schluß zulassen, daß beim Epimerasemangel in Erythrozyten die Menge an UDP-Galaktose nicht wesentlich erhöht ist, obwohl dies von der Theorie her vielleicht zu erwarten wäre. Daß diese Patienten, die ja eigentlich keine sind, eine genügende Epimeraseaktivität in anderen Zellen besitzen, so zu 100% in Fibroblasten, könnte diese "Normalität" erklären. Man weiß hingegen, daß bei Epimerasepatienten nach Galaktosekonsum eine Erhöhung des Galaktose-1-Phosphats in Erythrozyten meßbar ist. Eine Messung der UDP-Galaktose nach einer Milchmahlzeit wäre insofern interessant gewesen, war aber organisatorisch nicht möglich. Im Gegenteil, wird bei den beiden Patienten eine konsequente Galaktoserestriktion durchgeführt, da der eine Patient eine ausgesprochene Galaktoseintoleranz mit Zeichen der klassischen Galaktosämie aufweist, der andere im Alter von 11 Jahren an einer bilateralen Katarakt und Proteinurie erkrankt ist. Man könnte hier also von einer dritten Variante

des Epimerasemangels sprechen, des auf Erythrozyten beschränkten mit klinischer Symptomatik. Anzumerken bleibt ferner, daß eine Konzentration von UDP-Glukose bei den Patienten nicht meßbar war. Da es aber nur zwei Patienten waren, scheint eine Aussage hierüber zu spekulativ.

Die Gruppe der Heterozygoten, sowohl des Uridyltransferase- wie auch des Epimerasemangels, erscheinen hier bezüglich der Mengen an UDP-Galaktose und UDP-Glukose im Normbereich, wobei die Konzentrationen bei den Transferasemangel-Heterozygoten durchschnittlich höher lagen als die der Heterozygoten für den Epimerasemangel. Endgültige Aussagen sind aber schon im Hinblick auf die geringe Anzahl der Messungen schwierig.

Die Methode der Messung der UDP-Galaktose hat akademisches Interesse, insofern als es bisher nicht gelungen ist, mit anderen, weniger empfindlichen Methoden diesen Metaboliten zu messen.

Desweiteren war es interessant festzustellen, daß dieses Stoffwechselprodukt bei Galaktosämiepatienten tatsächlich signifikant erniedrigt ist, was in Theorie zu fordern war.

Ihr klinischer Wert liegt in der zur Verfügungstellung eines weiteren Laborbefundes zur Überwachung von Galaktosämiepatienten, wobei der UDP-Galaktose eine geringere Rolle zukommt als dem Galaktose-1-Phosphat.

Beim generalisierten Epimerasemangel wäre sie nützlich als Möglichkeit, die notwendige Galaktoserestriktion auf das richtige Maß einzustellen, da sie ja hier nicht vollkommen sein darf.

Ob die Messung der UDP-Galaktose auch eine Hilfe bei der Aufklärung der Pathophysiologie der Komplikationen der Galaktosämie wird leisten können, bleibt abzuwarten.

Hypothetisch sei hier angemerkt, daß die signifikante Erniedrigung der UDP-Galaktose bei Galaktosämiepatienten vielleicht beim Aufbau von Gangliosiden hinderlich ist und insofern eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der neurologischen Spätschäden (9,10) gut therapierter Patienten spielen könnte.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird eine Methode zur Messung der UDP-Galaktose in Erythrozyten vorgestellt. Sie besteht in einem Enzymassay unter Verwendung der Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase. Da dieses Enzym für die UDP-Galaktose nicht spezifisch ist, da es genauso mit UDP-Glukose reagiert, verlangt die Messung der UDP-Galaktose eine weitere unabhängige Korrekturmessung der UDP-Glukose, die dann von der ersten gemeinsamen Messung abgezogen werden muß. Diese zweite Methode wurde ebenfalls entwickelt und verwendet das Enzym UDP-Glukose-Pyrophosphorylase. Beide Messmethoden basieren auf der Ionenaustauschchromatographie in der von Shin et al. entwickelten Minisäule (1).

Die Methode zur Messung der UDP-Galaktose wurde weiter auf Fehler untersucht: Eine Recovery verlief erfolgreich, weder Galaktose-1-Phosphat noch EDTA noch wiederholtes Auftauen beeinträchtigten sie.

Die Korrekturmessung der UDP-Glukose wurde ebenfalls methodisch abgesichert. Ein Recoveryversuch gelang, und eine Untersuchung der verwendeten UDP-Glukose-Pyrophosphorylase kam zum Ergebnis, daß die Spezifität des Enzyms zur Messung der UDP-Glukose ausreicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Kontrollpersonen, UT-Galaktosämiepatienten, Personen mit Epimerasemangel und deren heterozygote Verwandte auf ihre Mengen an UDP-Galaktose in Erythrozyten untersucht.

Ergebnis war die Erstellung eines Normbereichs für UDP-Galaktose zwischen 0,285- 0,407 $\mu\text{Mol/g Hb}$ bzw. 4,03 - 6,15 mg /dl und für UDP-Glukose zwischen 0 - 0,065 $\mu\text{Mol/g Hb}$ bzw. zwischen 0 - 1,04 mg /dl. Bei Kontrollpersonen lag das Verhältnis zwischen UDP-Galaktose und UDP-Glukose bei 10:1 bis 10:3.

Bei UT-Mangel-Galaktosämiepatienten konnte eine signifikante Erniedrigung der UDP-Galaktose um durchschnittlich auf ein Drittel des Normalen festgestellt werden. Der Bereich der

Galaktosämiepatienten lag zwischen 0,072 - 0,162 $\mu\text{Mol/g}$ Hb bzw. 0,91 - 2,32 mg /dl und war somit klar von der Kontrollgruppe getrennt.

Die gemessenen Mengen an UDP-Glukose waren hingegen doppelt so hoch, und so bestand bei Galaktosämiepatienten ein Verhältnis von UDP-Galaktose zu UDP-Glukose von 2:1.

Bei der Patientengruppe erklärt sich aus dem Enzymmangel selbst die geringere Menge an UDP-Galaktose, wird dieser Metabolit doch zum Großteil durch Vermittlung der Uridyltransferase gebildet.

Bei Epimerasepatienten konnte entgegen den Vermutungen keine wesentliche Erhöhung der UDP-Galaktose festgestellt werden (diese Patienten standen jedoch unter Galaktoserestriktion), ebenso befanden sich die Konzentrationen bei Heterozygoten für UT-Mangel wie auch für Epimerasemangel im Normbereich.

Die Messung der UDP-Galaktose stellt ein weiteres Laborparameter zur Überwachung von Galaktosämiepatienten zur Verfügung. Sie eignet sich zur Diäteeinstellung und Therapieüberwachung beim generalisierten Epimerasemangel.

7. Bibliographie

- 1) SHIN-BUEHRING Y S, ZIEGLER R, OSANG M, SCHAUB J:
A simple assay for galactokinase using DEAE-cellulose column chromatography. Clin Chim Acta 74: 1 - 5, 1977.
- 2) KOCH R, ACOSTA P, DONNELL GN, LIEBERMAN E: Nutritional therapy of galactosemia. Clin Pediatr (Phila) 4:571. 1965
- 3) GITZELMANN R, HANSEN R G: Galactose metabolism, hereditary defects and their clinical significance. Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism. MTP press limited International Medical Publishers, Lancaster 1980
- 4) BEUTLER E, MATSUMOTO F, KUHL W, KRILL A, LEVY N, SPARKES R, DEGNAN M: Galaktokinase deficiency as a cause of cataracts N. Engl. J Med 288, 1203, 1973
- 5) LITMAN N, KANTER A, FINBERG L: Galactokinase deficiency presenting as pseudotumor cerebri. J Pediatr 86:410, 1975
- 6) HAYMAN S, KINOSHITA JH: Isolation and properties of lens aldose reductase. J Biol Chem 240:877, 1965
- 7) KINOSHITA JH, MEROLA LD: Hydration of the lens during the development of galactose cataracts. Invest Ophthalmol 3:577, 1964
- 8) STEINMANN B, GITZELMANN R, ZACHMANN M: Hypogonadism and galactosamia N Engl J Med 205:464, 1981
- 9) LO W, PACKMANN S, NASH S, SCHMIDT K, IRELAND S, DIAMOND I, DONNEL G: Curious Neurologic Sequelae in Galactosamia Pediatr. 73:309, 1984

- 10) BÖHLES H. WENZEL D. SHIN Y.S. Progressive cerebellar and extrapyramidal motor disturbances in galactosaemic twins Eur J Pediatr 145:413, 1986
- 11) BERGER H M, VLASFELD L, VAN GELDEREN H H, RUYS J H, Low serum thyroxine concentrations in babies with galactosemia. J Pediatr 103:930, 1983
- 12) SIDBURY JB: The role of galactose-1-phosphat in the pathogenesis of galactosemia, in GARDNER LE (ed): Molecular Genetics and Human Disease. Springfield, Ill, Charles C THOMS, Publisher, 1960 p 61
- 13) BEUTLER E, BALUDA MC: A simple spot screening test for galactosemia J Lab clin Med 68:137, 1966
- 14) SHIN-BURHING YS, OSANG M, ZIEGLER R, SCHAUB J. A method for galactose-1-phosphate uridylyltransferase assay and the separation of its isoenzymes by DEAE-cellulose column chromatography. Clin Chim Acta 70: 371-377, 1976
- 15) KOMROWER GM, LEE DH: Long term follow-up of galactosemia. Arch Dis Child 45:367, 1970
- 16) Artikel: "Clouds over Galactosemia" Lancet Dec.18 1982, 1379
- 17) GITZELMANN R, STEINMANN B, MITCHELL, B. and HAIGIS, E.: Uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. IV Report of eight cases in three families. Helv paed Acta 31:441, 1976
- 18) BOWLING FG, DAVID K B, FRASER A, CLAGUE A, DARRYL B: A case of Uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. L Med J Australia 144:150, 1986
- 19) HOLTON JB, GILLET M, MAC PAUL R, YOUNG R: Galactosaemia: A new severe variant due to uridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. ARCH DIS Child 56:885, 1981

- 20) GITZELMANN R: Deficiency of uridine diphosphate galactose-4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. *Helv Paediatr Acta* 27:125, 1972
- 21) SHIN Y S, RÜCKER A v, RIETH M, ENDRES W: Assay of UDP-Galactose-4-Epimerase. *Clin Chem* 28:2332, 1982
- 22) REUSS A v: Zuckerausscheidung im Säuglingsalter. *Wien Med Wochenschr* 58:800, 1908
- 23) FANCONI G.: Hochgradige Galactose-Intoleranz (Galaktose-Diabetes) bei einem Kinde mit Neurofibromatosis. *Jb Kinderheilk.* 138:1, 1933
- 24) MASON HH, TURNER ME: Chronic galactosemia. *Am J Dis Child* 50:359, 1935
- 25) KOSTERLITZ H W: Galactose-1-phosphate in the liver during galactose assimilation *J Physiol* 93:94 p, 1938
- 26) KOSTERLITZ, H W: The structure of the galactose-1-phosphate present in the liver during galactose assimilation. *Biochem. J* 37:318, 1943
- 27) CAPUTTO R, LELOIR L F, TRUCCO R E, CARDINI C E, PALADINIA A C. The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives. *J Biol Chem* 179:497, 1949
- 28) LELOIR LF: Enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into galactose derivative. *Arch Biochem Biophys* 33:186, 1951
- 29) SCHWARZ V, GOLDBERG L, KOMROWER GM, HOLZEL A: Some disturbances of erythrocyte metabolism in galactosemia. *Biochem J* 62:34, 1956

- 30) KALCKAR HM, ANDERSON EP, ISSELBACHER K J: Galactosemia, a congenital defect in a nucleotide transferase. *Biochim Biophys Acta* 20:262, 1956
- 31) ISSELBACHER K J: Evidence for an accessory pathway of galactose metabolism in mammalian liver. *Science* 126:652, 1957
- 32) GITZELMANN R: Deficiency of erythrocyte galactokinase in a patient with galactose diabetes. *Lancet* 2:670, 1965
- 33) GITZELMANN R: Deficiency of uridine diphosphate galactose-4-epimerase in blood cells of an apparently healthy infant. Preliminary communication. *Helv Paed Acta*, 27:125, 1972
- 34) PESCH LA, SEGAL S, TOPPER Y: Progesterone effects on galactose metabolism in prepubertal patients with congenital galactosemia and in rats maintained on high galactose diets. *J Clin Invest* 39:178, 1960
- 35) EDLER TD, SEGAL S, MAXWELL ES, TOPPER Y: Some steroid hormone like effects of menthol. *Science* 132:255, 1960
- 36) SEGAL S: isotopic studies of galactose oxidation in galactosemia, in Hsia D (ed): *Galactosemia*. Springfield, III, Charles C Thomas, Publisher, 1969 p 42.
- 37) SEGAL S, ROTH H, BLAIR A: Observations of orotic acid on galactose metabolism in congenital galactosemia. *J Pediatr* 68:135, 1966
- 38) JORDAN E, YARMOLINSKY MB, KALCKAR HM: Control of inducibility of enzymes of the galactose sequence in *escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 48:32, 1962

- 39) BUTTIN G: Mechanismes regulateurs dans la biosynthese des enzymes du metabolisme du galactose chez E. coli K-12: I. La biosynthese induite de la galactokinase et l'induction simultanee de la sequence enzymatique. J Molec Biol 7:183, 1963
- 40) WU HCP, KALCKAR HM: Endogenous induction of the galoperon in E coli K-12. Proc Natl Acad Sci USA, 55:622, 1966
- 41) KALCKAR HM, KURAHSASHI K, JORDAN E: Hereditary defects in galactose metabolism in E coli mutants 1. Determination of enzyme activities. Proc Natl Acad Sci USA 45:1776, 1959
- 42) SUNDARARAJAN TA, RAPIN AM, KALCKAR HM: Biochemical observations on E coli mutants defective in uridine diphosphoglucose. Proc Natl Acad Sci USA 48:2187, 1962
- 43) FUKASAWA T, JOKURA K, KURAHASHI H: Mutations in E coli that affect uridine diphosphate glucose purphosphorylase activity and galactose fermentation. Biochem Biophys Acta 74:608, 1963
- 44) SUNDARARAJAN TA: Interference with glycerokinase induction in mutants of E coli accumulating galactose-1-phosphate. Proc Natl Acad Sci USA 50:463, 1963
- 45) MORSE ML: Preliminary genetic map of seventeen galactose mutations in E coli K-12. Proc Natl Acad Sci USA. 48:1314, 1962
- 46) BUTTIN G: Sur la structure de l'operon galactose chez E coli K12. CR Acad Sci (Paris) 255:1233, 1962
- 47) ADLER J, KAISER AD: Mapping of the galactose genes of Escherichia coli by transduction with phage PI: Virology 19:117, 1963

- 48) BUTTIN G: Mechanismes regulateurs dans la biosynthese des enzymes du metabolisme du galactose chez E coli K-12.II. Le determinisme genetique de la regulation. J Molec Biol 7:183, 1963
- 49) ADLER J, TEMPLETON: The amount of galactose genetic material in delta dg bacteriophage with different densities. J Molec Biol 7:710, 1963
- 50) MORSE ML, LEBERBERG EM, LEBERGERG J: Transduction in E coli K-12. Genetics 41:142, 1956
- 51) MERRIL CR, GEIER MR, PETRICCIANI JC: Bacterial virus gene expression in human cells. Nature (Lond.) 233:398, 1971
- 52) SHIN Y S, NIEDERMEIER H P, ENDRES W, SCHAUB J, WEIDINGER S: Agarose gel isoelectrofocusing of UDP-galactose pyrophosphorylase and galactose-1-phosphate uridyl- transferase. Developmental aspect of UDP-galactose pyrophosphorylase. Clin Chim Acta 166: 27, 1987
- 53) MAXWELL E S: The enzymic interconversion of uridine diphosphogalactose and uridine diphosphoglucose J Biol Chem 229:139, 1957
- 54) FUJIMURA Y, KAWAMURA M, NARUSE H: A new mass screening method of detecting UDP-galactose-4-epimerase deficiency. Tohoku J exp med 131:15, 1980
- 55) HENDERSON N J: Unpublished observation Liverpool 1981 siehe Bibliographie 19) HOLTON
- 56) ESSELBACHER K J, KRANE S M: Studies on the mechanism of the inhibition of galactose oxidation by ethanol. J Biol Chem 236:2394, 1961

- 57) SHIN-BUEHRING Y S, SCHAUB J: Pitfalls in the radioactive method of galactose-1-phosphate uridyltransferase activity measurement. Clin Chim Acta 106:231-234, 1980
- 58) SCHAUB J, SHIN Y S, WIESE B, RAHM P, HAAS B. Metabolism of galactose and accumulation of galactose-1-phosphate in various cell types of cultured fibroblasts for galactosemia: Hommes FA. ed. Models for the study of inborn errors of metabolism. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979: 319
- 59) KEPPLER D, FROHLICH J, REUTER W, WIELANG O, DECKER K: Changes in uridine nucleotides during liver perfusion with D-galactosamine. FEBS Lett 4:278, 1969
- 60) BERTOLI D, SEGAL S: Developmental aspects and some characteristics of mammalian galactose-1-phosphate uridyltransferase. J Biol Chem 241:4023, 1966
- 61) SEGAL S, ROGERS S: Nucleotide inhibition of mammalian liver galactose-1-phosphate uridyltransferase. Biochem Biophys Acta 1980 250:351, 1971
- 62) KNOP J, HANSEN R: Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. IV. Crystallization and properties of the enzyme from human liver. J Biol Chem 245:2499, 1970
- 63) STEELMAN VS, EBNER KE: The enzymes of lactose biosynthesis. I. Purification and properties of UDPG pyrophosphorylase from bovine mammary tissue. Biochim Biophys Acta 128:92, 1966

. Lebenslauf

- 1959 Geboren: 19. Januar in Mayen/Eifel
 Religionszugehörigkeit: Römisch-katholisch
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Vater: Alexander Hoyer, Computersoftware-Ingenieur
 bei AEG in Konstanz
 Mutter: Helga Hoyer, geb. Schmidt, Erste Staats-
 anwältin in Konstanz
 Zwei Geschwister
- 1964 - 1975 Kindheit und Jugendzeit in Konstanz. Besuch des
 naturwissenschaftlichen Gymnasiums A. v. Humboldt
- 1976 Austauschschüler in den USA
- 1977 - 1979 Oberstufe und Reifeprüfung in der Internatsschule
 Schloss Salem
- 1979 - 1980 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
 Universität Kiel
- 1981 - 1982 Weitere Vorklinik und Physikum in München (TU)
- 1983 1. Staatsexamen in München
- 1984 1. Studienjahr in Paris, Beginn der Dissertation in
 München, Thema: Zur Messung der UDP-Galaktose
- 1985 2. Staatsexamen in München, Beginn des Praktischen
 Jahres in Paris
- 1986 Abschluß des französischen Studiengangs mit Examen,
 allgemeinärztliche Tätigkeit während 3 Monate in
 in Brasilien, Abschluß des deutschen Studiengangs
- 1987 Assistenzarzt im Städtischen Krankenhaus Stockach
 Männerabteilung für Chirurgie und Innere Medizin

